

**HEMMUNG DER INAKTIVIERUNG KONJUGierter
BAKTERIOPHAGEN ALS METHODE ZUM EMPFINDLICHEN
NACHWEIS VON STAPHYLOKOKKEN ENTEROTOXIN B**

Heinz-Peter Scheuber

1977

Aus dem Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen
Südbayern - Fachbereich Veterinärmedizin - Oberschleißheim
(Leiter: Prof. Dr.med.vet. Gg. Beck, Ltd.Veterinärdirektor)

vorgelegt über das
Institut für Med.Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen-
medizin des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. Anton Mayr

Hemmung der Inaktivierung konjugierter
Bakteriophagen als Methode zum empfindlichen
Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Heinz-Peter Scheuber
aus
Neuendettelsau

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. G. Beck
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

	Seite
3. 7. Gewinnung von IgG-Subklassen	15
3.7.1. Immunglobulin-Rohfraktion	15
3.7.2. Chromatographie an Sephadex G-200	16
3.7.3. DEAE-Sephadex A50	17
3. 8. Elektrophoretische Charakterisierung der IgG-Subklassen	17
3.8.1. Immunelektrophorese	17
3.8.2. Disk-Elektrophorese	18
3. 9. Herstellung SEB-konjugierter Bakterio- phagen (SEB-T ₄)	18
3.10. Nachweis von Anti-SEB Antikörper	19
3.10.1. Präzipitierende Anti-SEB Antikörper	19
3.10.2. Inaktivierung von SEB-T ₄ durch Anti-SEB Antikörper	20
3.11. Hemmung der Inaktivierung von SEB-T ₄	20
3.12. Proteinbestimmung	20
3.12.1. Biuret-Methode	20
3.12.2. Proteinbestimmung durch Extinktions- messung	21
4. ERGEBNISSE	22
4.1. Reinigung von SEB	22
4.2. Immunisierung	26
4.3. Isolierung und Charakterisierung von IgG-Subklassen	28
4.3.1. Serum	28
4.3.2. Kolostralmolke	31

	Seite
4.4. Antikörper	36
4.4.1. Präzipitierende Antikörper	36
4.4.2. Phagen-inaktivierende Antikörper	37
4.5. Verteilung von Anti-SEB Antikörpern in IgG-Subklassen	42
4.6. Hemmung der Inaktivierung von SEB-T ₄ als Nachweismethode für SEB	44
5. DISKUSSION	46
6. ZUSAMMENFASSUNG	54
LITERATURVERZEICHNIS	58

ABKÜRZUNGEN
=====

Ig	:	Immunglobulin
IgG	:	Immunglobulin G
IgG ₂	}	Subklassen von bovinem IgG
IgG ₁		
IgG _S		
SEB	:	Staphylokokken Enterotoxin B
KSA	:	Kaninchenserumalbumin
BGG	:	Bovines Immunglobulin G
SEB-KSA	:	SEB-Kopolymere
SEB-T ₄	:	SEB-konjugierte Bakteriophagen
PFU	:	Plaque forming units
UPM	:	Umdrehungen pro Minute
S	:	Sedimentation in Svedberg-Einheiten

1. Einleitung

=====

Staphylokokken Enterotoxine sind Proteine, die von *Staphylococcus aureus* im Lebensmittel produziert werden können oder unter experimentellen Bedingungen im Kulturüberstand von Staphylokokken-Kulturen nachzuweisen sind. Nach dem Genuß mit Staphylokokken Enterotoxin kontaminierter Lebensmittel kommt es zum Auftreten von Intoxikationen, also zu Lebensmittelvergiftungen, die in allen Ländern der Welt beobachtet wurden (4, 30). Wie statistische Untersuchungen aus dem Jahre 1969 ergeben haben, betrug der Anteil von Staphylokokken Enterotoxämien an der Gesamtzahl der aufgetretenen Lebensmittelvergiftungen etwa 25 % (36). Damit gehören Staphylokokken Enterotoxämien zu den häufigsten Lebensmittelvergiftungen überhaupt. Etwa 1 - 5 Stunden nach Aufnahme enterotoxinhaltiger Lebensmittel kommt es zum Auftreten klinischer Symptome, wie Erbrechen, Diarrhoe sowie in der Regel zum Kreislaufkollaps. Das Krankheitsbild kann bereits nach einigen Stunden bzw. nach etwa drei Tagen wieder abklingen (4).

Bisher sind sechs verschiedene Enterotoxintypen bekannt (55), die über individualspezifische Antigendeterminanten verfügen und mit Hilfe spezifischer Antisera zu charakterisieren sind (8). Das mit hoher Frequenz bei Lebensmittelvergiftungen vorkommende Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wurde als erstes von BERGDOLL und Mitarbeitern (5) gereinigt, mit dem Ziel, Strukturen mit biologischen Funktionen zu korrelieren.

Gereinigtes SEB hat ein Molekulargewicht von 30 000 mit einem Stickstoffgehalt von 16,1 % sowie einem Sedimentationskoeffizienten ($S_{20,w}^0$) zwischen 2,3 und 2,78 (7).

SEB besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, aufgebaut aus 239 Aminosäureresten, mit einem hohen Anteil an Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin (7).

Wie Sequenzuntersuchungen ergeben haben, befinden sich zwischen den Positionen 92 und 112, also nahe dem Zentrum der Kette, zwei Cystein-Reste (21), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und eine Aminosäureschlinge bilden.

Die chemische Modifizierung von Aminogruppen des Moleküls durch Acetylierung, Succinylierung und Carbamylierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Toxizität (8). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß der Verlust an Toxizität mit einer Modifikation der antigenen Spezifität korreliert war.

SEB erwies sich gegenüber proteolytischen Enzymen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Rennin und Papain als resistent. Pepsin hingegen detoxifiziert das Molekül bei einem pH von 2,0 (8). Experimentelle Daten sprechen dafür, daß SEB zu den hitzeresistentesten Enterotoxintypen gehört, da ein Kochen für 30 Minuten nicht ausreicht, um das Molekül vollständig zu detoxifizieren (8).

Der Nachweis von SEB im Lebensmittel stützt sich heute auf zwei Verfahren: 1. Bestimmung der biologischen Aktivität von SEB durch intraperitoneale und intravenöse Injektionen an Katzen (11) oder durch den Fütterungsversuch an jungen Rhesusaffen (56). Da sich heute bei der Beschaffung von Rhesusaffen kaum zu überwindende Schwierigkeiten ergeben und die Haltungskosten sehr hoch sind, kommt diese Spezies für die Routinediagnostik nicht in Betracht. Deshalb konzentrieren sich die Nachweisverfahren von SEB immer mehr auf: 2. immunologische Parameter, von denen zu fordern ist, daß sie einen schnellen und sensitiven Nachweis ermöglichen. Als solche bieten sich Präzipitationsverfahren wie Oudin-Test (6, 15, 43, 46, 55, 60), die lineare Doppeldiffusion (40), Doppeldiffusion in Agar-Gel (41) sowie die radiale Diffusion nach MANCINI (32, 55) an.

Diese Verfahren gestatten den Nachweis von SEB im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 μg . Die "Rocket Elektrophorese" nach LAURELL (29) ermöglicht es, SEB relativ schnell und in geringen Konzentrationen (0,1 μg) nachzuweisen (55). Als wesentlich empfindlicher haben sich Hämagglutinations-Methoden (9, 22, 52, 55) erwiesen, die entweder in Form der Hämagglutinationshemmung oder der reversen Hämagglutinationshemmung den Nachweis von SEB noch im Nanogramm-bereich gestatten. Das gleiche gilt im Prinzip für radioimmunologische Nachweisverfahren (10, 23, 24). SOMMERFELD und Mitarbeiter (55) kamen in einer Vergleichs-

studie über die Empfindlichkeit immunologischer Bestimmungsmethoden für SEB zu ähnlichen Ergebnissen.

Essentiell für die Empfindlichkeit immunologischer Verfahren ist die Qualität der zum Nachweis von SEB eingesetzten Antikörper. In diesem Zusammenhang fällt auf, daß standardisierte Immunisierungsverfahren zur Gewinnung quantitativ und qualitativ hochwertiger Anti-SEB Antikörper nicht existieren. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß aktives Toxin besser geeignet ist als Toxoid (formalinisiertes SEB), die Synthese von Anti-SEB Antikörper zu induzieren (54). Mit dem Ziel, geeignete Immunogene herzustellen, wurden von SILVERMAN und Mitarbeitern (53, 54), WARREN und Mitarbeitern (58), bzw. von READ und BRADSHAW (47) Versuche zur schonenden Inaktivierung von SEB mit Formaldehyd bzw. Hitze durchgeführt.

Es ist das Ziel dieser Arbeit a) SEB chemisch zu modifizieren, um hierdurch die Toxizität des Moleküls zu vermindern und gleichzeitig die Immunogenität von SEB durch geeignete Polymerisationsverfahren zu steigern, b) durch Immunisierung von Rindern mit SEB-Kopolymeren unter möglichst wirtschaftlichen Gesichtspunkten die Synthese spezifischer Antikörper zu induzieren, c) die Verteilung der Antikörperaktivität innerhalb der IgG-Subklassen zu untersuchen, um gegebenenfalls mit Antitoxin assoziierte Globulinfraktionen für Testzwecke anzureichern, und d) mit Hilfe eines Hemmtestes (Hemmung der Inaktivierung von SEB-konjugierten T_4 -Bakteriophagen (SEB- T_4)) ein geeignetes Verfahren aufzubauen, das es gestattet, SEB noch in kleinsten Mengen nachzuweisen.

2. MATERIAL =====

2.1. Puffer

- PBS: Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
0,14 M NaCl gelöst in 0,01 M Phosphat-Puffer, mit
1 N Natronlauge auf pH 6,8 - 7,2 eingestellt.
- TGP: Tris-Glycin Puffer (nach PORATH (45))
0,2 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,5 M Glycin
0,02 % Natriumazid
Mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt.
- TPP: Tris-Phosphat Puffer
Stammlösung: 0,7 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Mit 4 % Phosphorsäure auf pH 8,6 eingestellt.
- PP: Phosphat-Puffer
0,1 M Natrium-di-hydrogenphosphat
Mit 70 % Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.
- TBS: Tris-NaCl Puffer
0,1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,2 M Natriumchlorid
0,002 M EDTA
Mit 10 N Salzsäure auf pH 7,7 eingestellt.

2.2. Nährböden

Bouillon

Fleischextrakt (Difco) *)	5,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Natriumchlorid	3,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat p.a.	2,0 g
Glucose	1,0 g
Aqua dest.	1,0 l
Mit 2 ml 4 % Natronlauge auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt.	

D_{1/5}-Platten

Fleischextrakt	5,0 g
Caseinpepton (tryptisch verdaut) (Brunnengräber) **)	15,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
Natriumchlorid	3,0 g
di-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat	2,3 g
Glucose	3,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Leitungswasser	1,0 l
Mit 6,5 ml 4 % Natronlauge auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt.	

*) Difco Laboratories Detroit, Mich. USA

**) Brunnengräber, Lübeck

Loeb-Platten

Bacto-Tryptose (Difco)	10,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
Natriumchlorid	8,0 g
Glucose	1,0 g
Bacto-Agar	15,0 g
Aqua dest.	1,0 l
2,8 % Kalziumdichlorid	10,0 ml
Mit 1,8 ml 4 % Natronlauge auf pH 7,0 - 7,1 eingestellt.	

Loeb-Weichagar

Bacto-Agar	6,0 g
ansonsten: siehe Loeb-Platten	

M9a-Nährmedium (nach ANDERSON (2))

Getrennt hergestellt und vor Gebrauch gemischt werden
für 1 l M9a-Nährmedium (End-pH 7,2):

M9a-Salzlösung

di-Natriumhydrogenphosphat-12-hydrat	7,0 g
Kalium-di-hydrogenphosphat p.a. (Merck) *)	3,0 g
Natriumchlorid	0,5 g
Ammoniumchlorid p.a. (Roth) **)	1,0 g
Aqua dest.	100,0 ml
Mit 2 % Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt (autoklaviert).	

*) Merck, Darmstadt

**) Roth, Karlsruhe

Aminosäurelösung

Casamino Acids (acid hydrolyzed) (Difco)	10,0 g
Aqua dest.	50,0 ml
Absorbiert mit 1,5 g Aktivkohle über 5 Minuten, filtriert und 30 Minuten im Dampftopf erhitzt.	
Glucoselösung 4 % (50 Minuten im Dampftopf erhitzt)	900,0 ml
Magnesiumsulfat 0,1 M (Merck) (autoklaviert)	10,0 ml
Kalzium-di-chlorid 0,1 N (autoklaviert)	10,0 ml

2.3. Färbelösungen

Amidoschwarzlösung nach de Jong

Amidoschwarz (Merck)	2,5 g
Eisessig (Merck)	50,0 ml
Methanol (Merck)	200,0 ml
Aqua dest.	250,0 ml

Coomassie I

Isopropanol (Merck)	625,0 ml
Eisessig	250,0 ml
Aqua dest.	1625,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) *	1250,0 mg

*) Serva, Heidelberg

Coomassie II

Isopropanol	250,0 ml
Eisessig	250,0 ml
Aqua dest.	2000,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G 250	125,0 mg

Coomassie III

Eisessig	250,0 ml
Aqua dest.	2250,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G 250	63,0 mg

2.4. Entfärber

Eisessig	200,0 ml
Methanol	800,0 ml
Aqua dest.	1000,0 ml

2.5. Versuchstiere

Für die Vorversuche wurden weibliche Kaninchen (weiße Neuseeländer) im Alter von 3 Monaten und einem Gewicht von 2,5 - 3 kg und Meerschweinchen (Rockefeller-Stamm) mit einem Gewicht von 300 - 400 g verwendet. Die Haltung der Kaninchen und Meerschweinchen erfolgte im offenen System bei Einhaltung strenger hygienischer Kautelen in voll konditionierten Versuchsterräumen ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchte von $55 \% \pm 5 \%$). Kaninchen und Meerschweinchen erhielten pelletiertes Fertigfutter (Standard-Diät, Eggersmann, Rinteln) und Trinkwasser zur ad libitum Aufnahme.

Für das eigentliche Versuchsprogramm standen insgesamt sechs Rinder (Höhenfleckvieh) im Alter von 2 - 3 Jahren und einem Gewicht von 500 kg zur Verfügung. Zwei Rinder befanden sich bei Versuchsbeginn im 4. Monat der Gravidität. Die Rinder bekamen bei Stallhaltung frisches Gras, Heu und Mineralstoffmischungen.

2.6. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)

Die Gewinnung des Rohtoxins erfolgte aus dem Überstand von *Staphylococcus aureus* Kulturen (Stamm 243; Food Research Institute) und wurde durch die Kombination von Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration im Prinzip nach dem von SCHANTZ (48) angegebenen Verfahren angereichert und weitgehend gereinigt. Dieses Präparat wurde in mehreren Chargen freundlicherweise von Prof. Dr. Terplan, Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Fachbereiches Tiermedizin der Universität München, für Versuche an Großtieren zur Verfügung gestellt.

2.7. Bakteriophagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden T_4 -Bakteriophagen verwendet, zu deren Vermehrung und Nachweis ein Stamm von *Escherichia coli*-B diente. Bakteriophagen und Wirtsbakterienstamm wurden freundlicherweise von Dr. Mossmann, Max Planck Institut für Immunbiologie, Freiburg zur Verfügung gestellt.

Der Wirtsbakterienstamm ließ sich gut im Bouillon und M9a-Nährmedium züchten und zeigte auf D_{1/5}-Platten überwiegend glatt und nur gelegentlich rauh wachsende Kolonien. Für die nachfolgenden Untersuchungen fanden ausschließlich Bakterien Verwendung, die in glatten Kolonieformen wuchsen.

2.8. Proteine

Kaninchenserumalbumin (KSA) wurde nach dem Verfahren von MICHAEL (35) hergestellt und durch Zonenelektrophorese an Geon Resin 427 (19) gereinigt.

Bovines Immunglobulin G (BGG) wurde nach dem Verfahren von HAMMER und Mitarbeiter (16) hergestellt.

2.9. Antisera

Antisera gegen Rinderserum und -Kolostrum wurden durch Immunisierung von Kaninchen nach einem bereits früher beschriebenen Verfahren (27) gewonnen.

Anti-Staphylococcae Enterotoxin B Antiserum wurde von der Fa. Makor Ltd., Jerusalem, Israel, bezogen und diente im Rahmen der Untersuchungen als Referenzserum.

3. METHODEN

=====

3.1. Anreicherung und Reinigung von SEB

Die Gewinnung des Rohtoxins sowie dessen Anreicherung und weitgehende Reinigung über mehrere Stufen erfolgte im Institut von Prof.Dr.Terplan im Prinzip nach dem von SCHANTZ (48) angegebenen Verfahren. Aus dem Rohtoxin wurde SEB durch Chromatographie an Bio-Gel P-60 gereinigt.

3.2. Untersuchung von SEB in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Analyse wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Modell E analytical centrifuge) bei 20°C und 52 000 UPM in einem An-H-Ti Rotor durchgeführt. Die Auswertung wurde mit einem Schlierenwinkel 60°, Philpot-Svensson-Optik vorgenommen. Das Präparat wurde in TBS gelöst und wies eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml auf.

3.3. Herstellung unlöslicher Kopolymere von SEB

SEB (29,4 mg) und 120 mg BGG wurden in 2,7 ml 0,1 M PP, pH 7,0 gelöst und 0,7 ml einer 2,5 % wässrigen Lösung von Glutaraldehyd (Schuchardt, München) tropfenweise bei konstantem Rühren zugesetzt (3). Das sich spontan bildende Gel wurde für 3 Stunden bei Zimmertemperatur belassen, anschließend in Aqua dest. homogen verteilt, 15 Minuten bei 3000 UPM in einer Kühlzentrifuge (International Equipment, Needham HTS, Mass. USA) zentrifugiert und so lange in Aqua dest. gewaschen,

bis die Extinktion der Waschüberstände gemessen bei 280 und 240 nm unter 0,02 lag. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration in den Waschüberständen ließ sich zeigen, daß 89,2 % des eingesetzten Materials vernetzt wurden. Zur Immunisierung von Rindern wurde KSA als Trägerprotein eingesetzt, das zu diesem Zweck in 0,1 M PP, pH 7,0 gelöst und im Verhältnis 8:1 bzw. 4:1 (w/w) mit SEB gemischt wurde. Anschließend erfolgte der Zusatz von 0,7 ml einer 2,5 % wässerigen Lösung von Glutaraldehyd tropfenweise bei konstantem Rühren (3). Die weitere Behandlung der Kopolymere erfolgte wie oben beschrieben.

3.4. Herstellung von Anti-SEB Antisera in Meerschweinchen und Kaninchen

Meerschweinchen und Kaninchen wurden mit Kopolymeren von gereinigtem SEB immunisiert. Zu diesem Zweck wurde das von FRANEK und SIMEK (12) beschriebene Verfahren in nachfolgender Weise modifiziert.

Kopolymeres SEB wurde in 0,25 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) gelöst und mit Willstätter's Aluminiumhydroxyd (Alu-Gel S, Serva, Heidelberg) für 60 Minuten bei 4°C gehalten und anschließend der Ansatz in komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco) inkorporiert.

Meerschweinchen und Kaninchen erhielten 100 µg bzw. 200 µg SEB-Kopolymere in 0,1 ml Portionen subcutan in die "foot pads". Die Restimulierung der Tiere erfolgte in einer

Dosierung von 500 ug bzw. 2,0 mg intramuskulär. 14 bzw. 28 Tage nach der 2. Immunisierung wurden die Tiere kardial geblutet, das Serum gewonnen und bis zur Verwendung bei -30°C tiefgefroren.

3.5. Immunisierung von Rindern

Für die Immunisierung standen vier nicht tragende Rinder (Nr. 1 - Nr. 4) und zusätzlich zwei gravide Tiere (4. Monat der Trächtigkeit) zur Verfügung. Nicht trächtige Tiere wurden primär stimuliert mit 160 mg SEB-KSA (Verhältnis 1:8 w/w) emulgiert in inkomplettem Adjuvans nach dem von FRANEK und SIMEK beschriebenen Verfahren (12). Die Applikation erfolgte intracutan an 20 - 30 verschiedenen Hautstellen (Bug, Kniefalte) in Dosen von jeweils 0,1 ml sowie intramuskulär nach folgendem Schema: Jeweils 3 ml im Bereich der Musculi semitendinei und der Musculi triceps brachii.

Die Rinder wurden 3 Monate nach der 1. Immunisierung mit 240 mg SEB-KSA intramuskulär nach dem bereits beschriebenen Schema und zusätzlich an 6 verschiedenen Stellen subcutan restimuliert. Nach einem Zeitintervall von 8 Monaten wurden lediglich zwei Rinder (Nr. 1 und Nr. 4) nochmals mit 500 mg SEB-KSA, jedoch inkorporiert in komplettem Freund'schen Adjuvans (Verhältnis 1:4 w/w) restimuliert.

Gravide Rinder Nr. 5 und Nr. 6 erhielten 500 mg SEB-KSA (Verhältnis 1:4 w/w) adsorbiert an Alu-Gel S und inkorporiert in komplettem Freund'schen Adjuvans nach dem bereits beschriebenen Applikationsschema.

3.6. Gewinnung von Serum und Kolostrum

Immunisierten Rindern wurden 10 und 20 Tage nach der 2. bzw. 3. Restimulierung Blutproben entnommen, das Serum durch Zentrifugation abgetrennt und bis zur Verwendung bei -30°C konserviert.

Kolostrum wurde innerhalb der ersten 24 Stunden im 6-Stundenrhythmus ermolken, entfettet und die Kolostralmolke nach dem von HAMMER und Mitarbeitern (16) beschriebenen Verfahren gewonnen.

3.7. Gewinnung der IgG-Subklassen

3.7.1. Immunglobulin (Ig) Rohfraktion

Serum bzw. Kolostralmolke wurde durch Verdünnung mit 0,15 M NaCl auf eine Proteinkonzentration von ca. 3 g/100 ml eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz im Eisbad gehalten und ein aliquotes Volumen einer 4 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7,0) unter ständigem Rühren zugesetzt und für die Dauer von 30 Minuten nachgerührt. Danach wurde für 20 Minuten bei 2 000 xg (4°C) zentrifugiert, das Sediment in PBS gelöst und durch Zusatz eines aliquoten Volumens 4 M Ammoniumsulfatlösung noch zweimal repräzipitiert. Das letzte Sediment wurde in PBS gelöst und ausgiebig gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wurde das Dialysat auf Freisein von SO_4^{--} geprüft und das Retentat durch Ultrafiltration ankonzentriert.

3.7.2. Chromatographie an Sephadex G-200

Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde gegen TGP, pH 7,6 äquilibriert und anschließend in eine Säule (3,5 x 100 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gepackt. Die Ig-Rohfraktion wurde gegen TGP, pH 7,6 äquilibriert und 50 ml, enthaltend 3 g Protein, auf die Säule aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte aufsteigend mit Hilfe einer Perplex-Pumpe (LKB-Producter, Stockholm, Schweden) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/Stunde.

Sämtliche Chromatographien wurden bei 2 - 4°C durchgeführt. Die Absorption eluierter Fraktionen wurde bei 280 nm mit Hilfe eines Uvicord II (LKB-Producter, Stockholm, Schweden) gemessen. Zur Aufnahme der Fraktionen diente ein in einer Kühlbox (Colora) installierter Fraktionskollektor (LKB-Producter, Stockholm, Schweden).

Durch Chromatographie an Sephadex G-200 wurden 2 Fraktionen erhalten (Fr.I und Fr.II). Die mit dem Totvolumen der Säule eluierte Fr.I repräsentiert die 19S Fraktion, während Fr.II gemessen am Verteilungskoeffizienten mit der 7S Fraktion identisch war. Zum Zwecke der weiteren Reinigung wurde Fr. II an Sephadex G-200 rechromatographiert.

3.7.3. DEAE-Sephadex A50

Die Fraktionierung der IgG-Rohfraktion nach Rechromatographie an Sephadex G-200 in IgG-Subklassen erfolgte nach dem Verfahren von KICKHÖFEN und Mitarbeitern (26). DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde gegen den Startpuffer, d.h. 0,02 M TPP, pH 8,6 äquilibriert, entlüftet und in eine Säule (1,6 x 50 cm) gefüllt. Die Gelmatrix wurde so lange mit dem Startpuffer gewaschen, bis das Effluat eine Leitfähigkeit von $3,3 - 3,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (20°C) sowie einen pH von 8,6 hatte. Von der IgG-Rohfraktion wurden 800 mg IgG (7S) gegen den Startpuffer äquilibriert und auf die Gelmatrix aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Konzentrationsgradienten, der über ein Vari-gradsystem auf die Säule aufgebracht wurde (44). Der Gradient bestand aus zwei linearen Sektionen (0,02 M - 0,06 M; 0,06 M - 0,7 M TPP, pH 8,6). Das Volumen der 1.Sektion entsprach der 2-fachen und das der 2.Sektion der 4-fachen Menge des eingesetzten Gelvolumens.

In gleicher Weise wurden Immunglobuline aus dem Kolostrum angereichert und gereinigt (17).

3.8. Elektrophoretische Charakterisierung der IgG-Subklassen

3.8.1. Immunelektrophorese

Immunelektrophoresen wurden nach der von HIRSCHFELD (20) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurde eine

Standard-Apparatur (Immunophor, LKB-Producter, Stockholm, Schweden) verwendet. Trägermedium war 1,5 % Agarose (Litex, Dänemark). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 220 Volt und 7 mA über eine Zeitspanne von 90 Minuten. Die Färbung der Gele erfolgte mit Amidoschwarzlösung nach de Jong.

3.8.2. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese erfolgte in 7,5 % Polyacrylamidgel in Gegenwart eines saueren Puffersystems, pH 5,0, das eine bessere Trennung der basischen Proteine mit einem Molgewicht von mehr als 2×10^4 ermöglichte, mit und ohne Natriumdodecylsulfat (SDS) (Gelsystem Nr. 8 nach MAURER (33)). Hierzu wurde ein aus Plexiglas gefertigtes Disk-Elektrophorese-Gerät (Eigenbau) verwendet. Zum Zwecke der Gelelektrophorese wurden IgG-Fraktionen in Konzentrationen von 0,1 mg/ml im Gelpuffer gelöst und in 100 μ l Portionen auf das Gel aufgetragen.

3.9. Herstellung SEB-konjugierter Bakteriophagen (SEB-T₄)

T₄-Bakteriophagen wurden an Escherichia coli-B-Kulturen nach dem von ADAMS beschriebenen Verfahren (1) propagiert und in nachfolgender Weise konjugiert (39): 0,4 ml einer T₄-Suspension ($A_{260}^{1\text{cm}} = 200$) wurden mit 0,1 ml SEB (50 mg/ml), gelöst in 0,05 M PP, pH 7,5, gemischt und anschließend 0,025 ml einer wässrigen Glutaraldehydlösung (0,05 %) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde kontinuierlich gerührt,

1 Stunde bei 24°C inkubiert und anschließend nach dem von HAIMOVICH (13) beschriebenen Verfahren behandelt.

Die quantitative Bestimmung infektiöser Einheiten (PFU) der Bakteriophagensuspension erfolgte nach einer Modifikation (38) der von ADAMS (1) beschriebenen Methode.

3.10. Nachweis von Anti-SEB Antikörpern

3.10.1. Präzipitierende Anti-SEB Antikörper

Die Analyse präzipitierender Anti-SEB Antikörper (IgG und IgG-Subklassen) erfolgte durch Doppeldiffusion in Agar-Gel (42) in 1,5 % Agarose (Litex, Dänemark) und Hirschfeld-Puffer pH 8,6 (20).

Zur Steigerung der präzipitierenden Eigenschaften von IgG Antikörpern bzw. von IgG-Subklassen wurden nachfolgende Verfahren eingesetzt:

a) Zusatz von 1- 4 % Polyäthylenglycol 6000 (Merck, Darmstadt) zu IgG-Fraktionen (18), b) nach Abschluß der Geldiffusion waschen der Präzipitate in 0,1 M L-DOPA (L-3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin) (Riedel de Haen) und 0,1 M PP, pH 7,2 für 10 - 16 Stunden bei Zimmertemperatur (50) und c) Herstellung von Lösungen in Rindervollseren, da die Bildung von unlöslichen Antigen-Antikörper Komplexen in Gegenwart hochmolekularer Serumproteine begünstigt wird.

3.10.2. Inaktivierung von SEB-T₄ durch Anti-SEB Antikörper

Die quantitative Bestimmung von Anti-SEB Antikörpern in nicht fraktionierten IgG bzw. in IgG-Subklassen (20 mg/ml) erfolgte durch Inaktivierung von SEB-T₄ und wurde ausgewertet mit Hilfe der Agar-Schichtmethode nach dem von ADAMS (1) beschriebenen Verfahren.

3.11. Hemmung der Inaktivierung von SEB-T₄

Für diesen Test wurde Anti-SEB Antiserum in einer Standardverdünnung 1:128 000 eingesetzt, die in der Lage war, 60 % SEB-T₄ innerhalb von 6 Stunden zu inaktivieren. Zu 0,2 ml Anti-SEB Antiserum wurden 0,6 ml SEB (Konzentrationsbereich von 100 µg - 1 ng/ml) zugesetzt, gut gemischt und der Reaktionsansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml einer SEB-T₄ Phagensuspension ($8,9 \times 10^{12}$ PFU) zugesetzt, der Ansatz für weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert (39) und danach die Zahl der überlebenden Bakteriophagen nach der von ADAMS beschriebenen Methode bestimmt (1). Die Berechnung der prozentualen Hemmung erfolgte aus der Größenordnung der Inaktivierung in Gegenwart und Abwesenheit der Hemmsubstanz (SEB).

3.12. Proteinbestimmung

3.12.1. Biuret-Methode

Die Proteinbestimmung erfolgte im Prinzip nach dem von KICKHÖFEN und Mitarbeitern (26) beschriebenen Verfahren mit

Hilfe von Biuret-Reagenz (59). Als Referenz diente eine 10 % Lösung von bovinem IgG, die eine optische Dichte von $E_{540\text{nm}}^{1\text{cm}} = 0,522$ ergab (26). In Gegenwart von Tris-Puffer wurde die Proteinkonzentration wie folgt bestimmt:

In Zentrifugengläsern wurden 50 μl einer Proteinlösung mit 0,5 ml 20 % Trichloressigsäure versetzt, gut gemischt und für 10 Minuten bei 4°C gehalten. Anschließend wurde 10 Minuten bei 3 000 xg und 4°C zentrifugiert, das Sediment in 0,5 ml einer 0,5 N Natronlauge gelöst und 0,5 ml einer 0,15 M Natriumchloridlösung zugegeben. Nach Zusatz von 1,0 ml Biuret-Reagenz wurde der Ansatz gut gemischt, 30 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten und anschließend bei 540 nm gemessen.

3.12.2. Proteinbestimmung durch Extinktionsmessung

Dabei wurden nachfolgende Extinktionskoeffizienten ($E_{280\text{nm}}^{1\text{cm}}$) zugrunde gelegt: $\text{IgG}_2 = 13,5$; $\text{IgG}_1 = 13,6$; $\text{IgG}_S = 13,7$ (26) und SEB = 14,4 (8).

Alle photometrischen Messungen wurden mit dem 139 UV-VIS-Spectrophotometer (Hitachi Perkin-Elmer, Japan) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

=====

4.1. Reinigung von SEB

SEB-Rohfraktionen wurden gegen TBS, pH 7,7 dialysiert und in Portionen von 100 mg Protein/5 ml an Bio-Gel P-60, 100-200 mesh (Säule: 100 x 1,6 cm) (Bio-Rad Lab. Richmond, Calif. USA) chromatographiert, wovon insgesamt 99 mg wiedergefunden wurden, die sich auf die einzelnen Fraktionen prozentual wie folgt verteilten:

Fr.I = 17,2 %; Fr.II = 36,3 %; Fr.III = 38,3 % und
Fr.IV = 8,2 %.

Ein für insgesamt neun Chromatographien repräsentatives Elutionsdiagramm ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Das Diagramm zeigt zwei "peaks", deren Einteilung in vier Fraktionen erfolgte. Anschließend wurden die Einzelfraktionen wie angegeben vereinigt, durch Ultrafiltration ankonzentriert und mit Hilfe von Anti-SEB Antiserum (Anti-SEB; Makor Ltd., Jerusalem, Israel) in der Ouchterlony Gel-diffusion auf das Vorhandensein von SEB analysiert. Hierbei zeigte sich, daß Fr. II, Fr.III und Fr.IV nach Reaktion mit Anti-SEB eine Präzipitationslinie bildete, die mit der eines Referenz-SEB (Makor Ltd., Jerusalem, Israel) total koaleszierte (Fr.III und Fr.IV), was ein Beweis für immunologische Identität ist. Fr.I hingegen zeigte keine Reaktion.

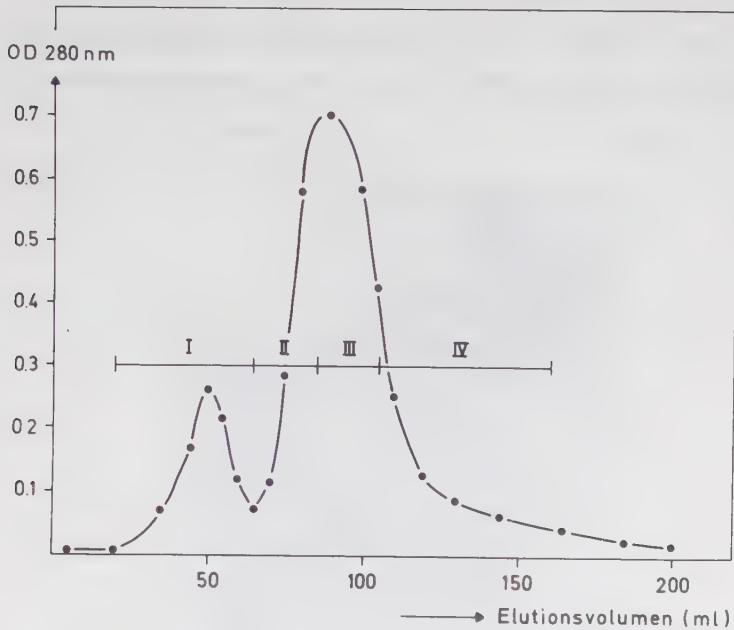


Abb. 1: Chromatographie einer SEB-Rohfraktion an Bio-Gel P-60. Nach Applikation von 100 mg Protein (Säule: 100 x 1,6 cm) erfolgte die Elution mit TBS, pH 7,7. Fraktionen I bis IV wurden innerhalb der angegebenen Markierungen vereinigt und auf das Vorhandensein von SEB analysiert.

Die Reinigung von SEB durch Chromatographie an Bio-Gel P-60 wurde mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von 0,1 % SDS (31) in Abb. 2 dokumentiert.



Abb. 2: Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Fr.I, III und IV nach Chromatographie eines SEB-Rohtoxins an Bio-Gel P-60 in Gegenwart von 0,1 % SDS. (R): SEB-Rohtoxin. Experimentelle Details siehe Material und Methoden.

Während Fr.I mindestens drei distinkte Banden zeigte, wies Fr.III lediglich eine geringgradige höhermolekulare Kontamination auf. Fr.IV war durch eine starke Bande charakterisiert, was für die Homogenität der Substanz spricht.

Fr.II wies lediglich geringe Kontaminationen auf und wurde zum Zweck der weiteren Reinigung an Bio-Gel P-60 rechromatographiert.

Die Fr.III wurde zusätzlich in der analytischen Ultrazentrifuge geprüft und erwies sich unter diesen Bedingungen als eine weitgehend homogene Substanz (Abb.3). Der Sedimentationskoeffizient (57) wurde hier mit $S_{20,w}^1 = 2,2 \times 10^{-13}$ bestimmt.

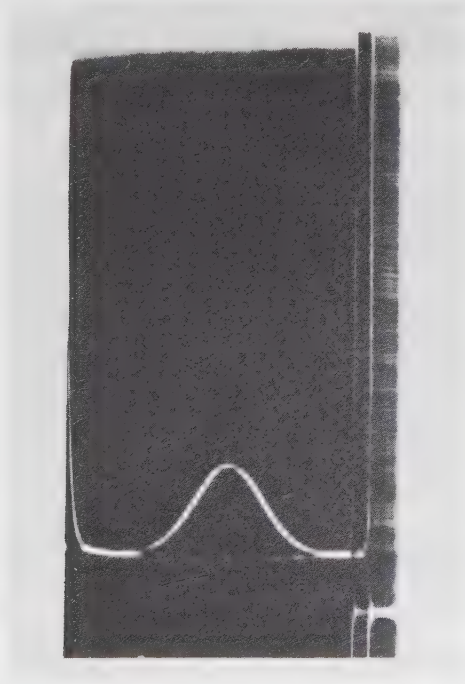


Abb. 3: Ultrazentrifugendiagramm von gereinigtem SEB. Proteinkonzentration 10 mg/ml in Tris-NaCl. Die Aufnahme erfolgte 139 Minuten nach Erreichen der vollen Drehzahl (52 000 UPM). $S_{20,w}^1 = 2,2 \times 10^{-13}$.

4.2. Immunisierung

Als Basis für Immunisierungsversuche am Rind wurden orientierende Versuche an Kaninchen und Meerschweinchen durchgeführt, um SEB-Kopolymere auf ihre toxischen Eigenschaften zu prüfen. Dabei zeigte sich, daß die Applikation von Dosen im Milligramm-Bereich, die normalerweise für Kaninchen hoch toxisch sind, von den Tieren reaktionslos vertragen wurden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß es im Prinzip gelingt, SEB-Moleküle durch Vernetzung weitgehend zu detoxifizieren.

Anschließend wurden Rinder mit jeweils 160 mg SEB-KSA nach dem im Abschnitt 3.5. beschriebenen Verfahren primär stimuliert. 6 - 8 Stunden nach der Applikation von SEB-KSA wurden bei allen Tieren folgende klinische Symptome beobachtet: Sistieren der Futteraufnahme, Diarrhoe unterschiedlichen Grades sowie signifikante Temperatursteigerung auf im Mittel $40,2^{\circ}\text{C}$. Innerhalb von 16 Stunden kam es zum Abklingen der klinischen Symptome und die Temperatur lag wieder im Normbereich. Nach ein- oder mehrfacher Restimulierung kam es lediglich zu einem Temperaturanstieg auf im Mittel $40,2^{\circ}\text{C}$ ohne weitere klinische Symptome. Entsprechend der Primärimmunisierung lag die Temperatur innerhalb von 16 Stunden wieder im Normbereich.

Ähnlich verhielten sich die graviden Rinder nach Immunisierung mit 500 mg SEB-KSA. Abgesehen von einer signifikanten Temperatursteigerung wurden keine weiteren klinischen Symptome beobachtet. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß Injektionen von SEB-KSA ohne jeden Einfluß auf die bestehende Gravidität waren. Als Folge der Intracutaninjektionen von SEB-Kopolymeren kam es zum Auftreten etwa fünfmarkstückgroßer Granulome (Abb. 4), die etwa 3 - 4 Wochen nach der Applikation aufbrachen.

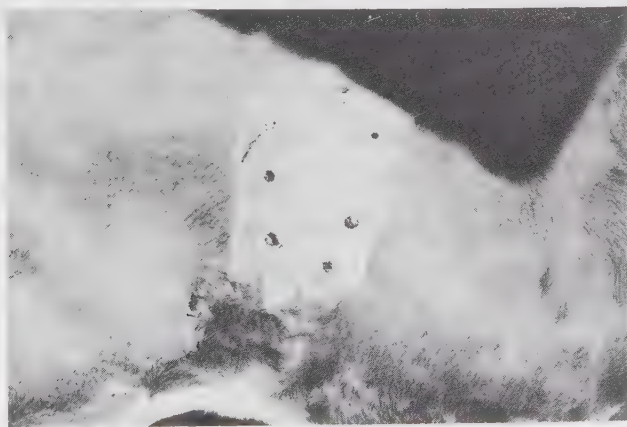


Abb. 4: Granulome in der Haut eines Rindes 3 - 4 Wochen nach intracutaner Applikation von SEB-KSA adsorbiert in Aluminiumhydroxyd und inkorporiert in komplettem Freund'schen Adjuvans.

4.3. Isolierung und Charakterisierung von IgG-Subklassen

4.3.1. Serum

Gewinnung einer Ig-Rohfraktion aus Anti-SEB Antiserum erfolgte durch Aussalzen mit 2 M Ammoniumsulfatlösung. Das Präzipitat wurde in PBS, pH 6,8 - 7,2 gelöst, gegen den gleichen Puffer dialysiert und durch Ultrafiltration eingengt. Aus 250 ml Anti-SEB Antiserum mit einem Proteingehalt von 17,4 g wurden 7,4 g wiedergefunden, was einer Ausbeute von ca. 43 % entspricht.

50 ml der Ig-Rohfraktion, enthaltend 3,0 g Protein, wurden gegen TGP, pH 7,6 äquilibriert und an einer Sephadex G-200 Säule chromatographiert. Wie das Elutionsdiagramm in Abb. 5 zeigt, wurden zwei Fraktionen erhalten (Fr.I und Fr.II). Anschließend wurde die Fr.II durch Ultrafiltration eingengt und an Sephadex G-200 rechromatographiert. Wie die immunoelektrophoretische Analyse ergab, enthielt die rechromatographierte Fraktion nahezu gereinigtes IgG und nur eine geringgradige Verunreinigung.

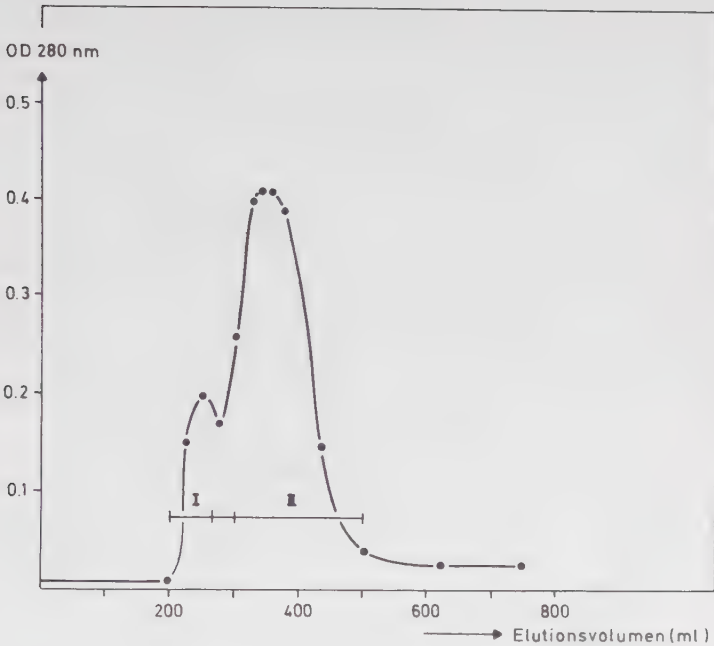


Abb. 5: Fraktionierung einer Ig-Rohfraktion aus Serum, gewonnen durch Aussalzen mit 2 M Ammoniumsulfatlösung an Sephadex G-200. Elution mit TGP, pH 7,6. Die Fr.I repräsentiert hochmolekulare 19S Ig, die Fr.II enthält 7S IgG.

Anschließend wurden 800 mg der an Sephadex G-200 rechromatographierten Fraktion an DEAE-Sephadex A50 chromatographiert. Wie Abb. 6 zeigt wurden drei Fraktionen

(Fr.I, Fr.II und Fr.III) erhalten, die mit den drei Subklassen des bovinen IgG, d.h. IgG₂, IgG₁ und IgG_S korrespondierten (26).

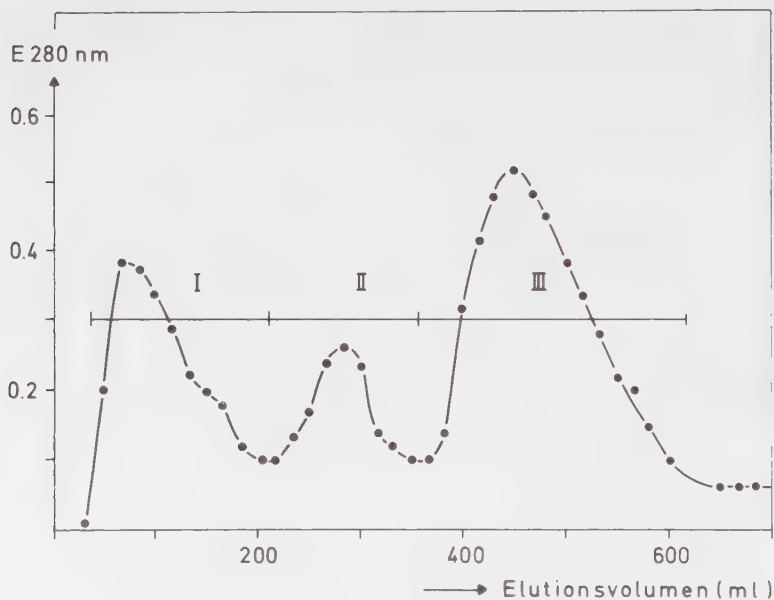


Abb. 6: Fraktionierung von 7S IgG an DEAE-Sephadex A50 nach Rechromatographie an Sephadex G-200. Die Elution erfolgte durch Aufbringen eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe eines Varigradsystems. Der Gradient bestand aus zwei linearen Sektionen (0,02 M $\rightarrow$ 0,06 M; 0,06 M $\rightarrow$ 0,7 M TPP, pH 8,6).

Von insgesamt 800 mg IgG wurden nach Chromatographie an DEAE-Sephadex A50 645 mg wiedergefunden, was einer Ausbeute von 80 % entsprach. Dabei ergab sich für die IgG-Subklassen nachfolgende prozentuale Verteilung: $\text{IgG}_2 = 21 \%$; $\text{IgG}_1 = 10 \%$ und $\text{IgG}_S = 69 \%$.

4.3.2. Kolostralmolke

Die Anreicherung von IgG erfolgte aus Anti-SEB Kolostralmolke durch Aussalzen mit 2 M Ammoniumsulfat. Das Präzipitat wurde in PBS, pH 6,8 - 7,2 gelöst, gegen den gleichen Puffer dialysiert und durch Ultrafiltration eingengt. Von insgesamt 400 ml Kolostralmolke mit einem Proteingehalt von 38,6 g wurden 15,8 g von der Ig-Rohfraktion wiedergewonnen, was einer Ausbeute von ca. 41 % entsprach.

50 ml der Ig-Rohfraktion, enthaltend 3,0 g Protein, wurden gegen TGP, pH 7,6 äquilibriert und an Sephadex G-200 chromatographiert und es wurden zwei Fraktionen erhalten (Fr.I und Fr.II). Die Fr.II wurde anschließend durch Ultrafiltration eingengt und an Sephadex G-200 rechromatographiert.

Von der an Sephadex G-200 rechromatographierten Fraktion wurden 800 mg an DEAE-Sephadex A50 chromatographiert. Wie Abb.7 zeigt, wurden drei Fraktionen (Fr.I, Fr.II und Fr.III) erhalten; die mit den drei Subklassen des bovinen IgG, d.h. IgG_2 , IgG_1 und IgG_S korrespondierten (26).

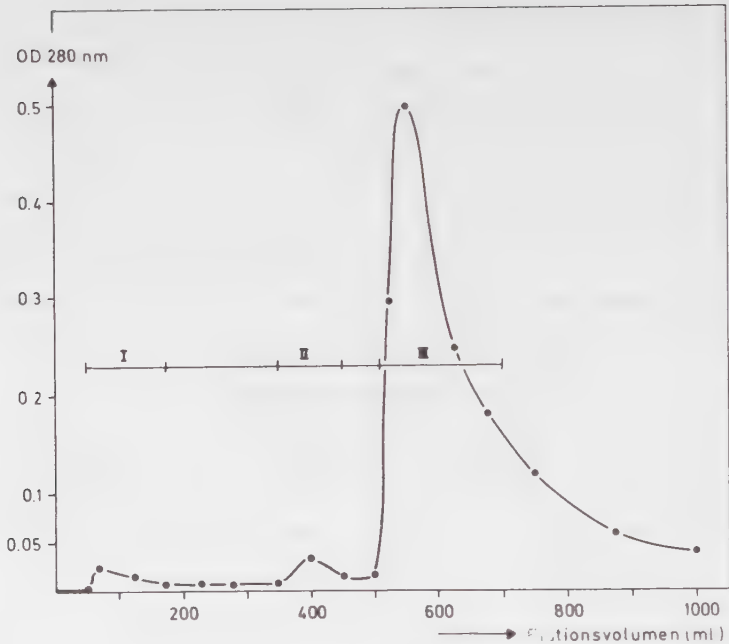


Abb. 7: Fraktionierung von 7S IgG an DEAE-Sephadex A50 nach Rechromatographie an Sephadex G-200. Die Elution erfolgte durch Aufbringen eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe eines Varigradsystems. Der Gradient bestand aus zwei linearen Sektionen (0,02 M - 0,06 M; 0,06 M - 0,7 M TPP, pH 8,6).

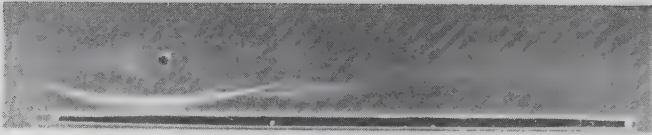
Von insgesamt 800 mg IgG wurden nach Chromatographie an DEAE-Sephadex A50 680 mg wiedergefunden, was einer Ausbeute von 85 % entsprach. Dabei ergab sich für die IgG-Subklassen

nachfolgende prozentuale Verteilung: $\text{IgG}_2 = 1,7 \%$;
 $\text{IgG}_1 = 1,3 \%$ und $\text{IgG}_S = 97 \%$.

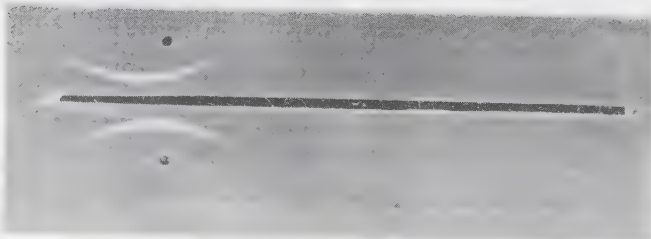
Wie die immunelektrophoretische Analyse in den Abb. 8a - 8c zeigt, enthielt die Ig-Rohfraktion überwiegend IgG, wies jedoch zusätzlich noch geringgradige Verunreinigungen mit Proteinen auf, die durch ihre Wanderung im β - bzw. α -Globulinbereich charakterisiert waren. IgG_2 , IgG_1 und IgG_S erwiesen sich, wie die Abb. 8b und 8c dokumentieren, als immunelektrophoretisch reine Fraktionen.

Sowohl die immunelektrophoretische Analyse als auch das Verhalten an DEAE-Sephadex A50 sprechen dafür, daß IgG-Subklassen durch ihre unterschiedliche Ladung charakterisiert sind. Demnach ist IgG_2 mehr basisch, während IgG_1 und IgG_S mit höheren Nettoladungen ausgestattet sind. Der endgültige Beweis für die Existenz von Subklassen wurde durch Absorptionsexperimente geführt, die zeigten, daß IgG_S von den übrigen Subklassen durch individualspezifische Determinanten unterschieden werden kann (26).

a)



b)



c)

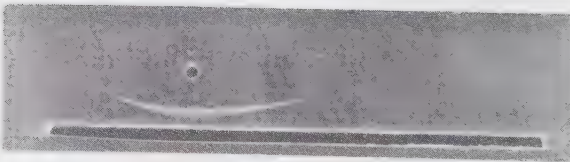


Abb. 8a - 8c: Immunelektrophoretische Analyse von IgG-Subklassen durch Fraktionierung von 7S IgG an DEAE-Sephadex A50.

a) Ig-Rohfraktion erhalten durch Fällung mit
2 M Ammoniumsulfat

b) oben: IgG₂, unten: IgG₁

c) IgG_S

Rinne: Antiserum gegen Kolostrum

Daß es sich um gereinigte Fraktionen handelt, wurde weiterhin durch die analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestätigt (Abb. 9). Hier wurden IgG_2 , IgG_1 und IgG_S durch eine einzige Bande repräsentiert, was für die Homogenität des Präparates spricht.

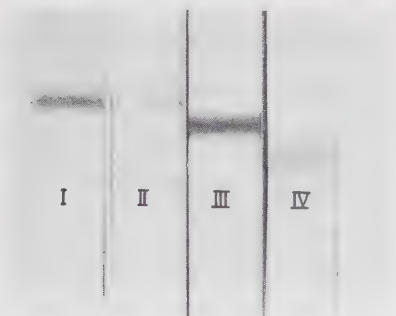


Abb. 9: Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese von IgG-Subklassen erhalten durch Fraktionierung von 7S IgG an DEAE-Sephadex A50; Gel 7,5 %. Details siehe Material und Methoden.
(I): 7S IgG nach Rechromatographie an Sephadex G-200;
(II): IgG_2 ; (III): IgG_1 ; (IV): IgG_S .

Wie Abb. 9 zeigt, ist IgG_S durch eine mehr anodisch wandernde Bande charakterisiert, was dafür spricht, daß das Molekül im Vergleich zu IgG_2 und IgG_1 eine höhere Nettoladung aufweist.

4.4. Antikörper

4.4.1. Präzipitierende Antikörper

Präzipitierende Antikörper wurden mit Hilfe der Doppeldiffusion in Agar-Gel (42) nachgewiesen. Dabei zeigte sich, daß kopolymeres SEB bei Kaninchen und Meerschweinchen die Synthese präzipitierender Antikörper induzieren kann.

Von immunisierten Rindern wurden Antisera 10 - 17 Tage nach der Restimulierung sowie gegebenenfalls das Kolostrum gewonnen und auf das Vorhandensein präzipitierender Antikörper untersucht. Wie Abb. 10 zeigt, reagierten die Antisera der Rinder Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 spezifisch mit nativem SEB, repräsentiert durch eine ausgeprägte Präzipitationslinie. Demgegenüber zeigte das Antiserum von Rind Nr. 3 eine vergleichsweise schwache Reaktion.

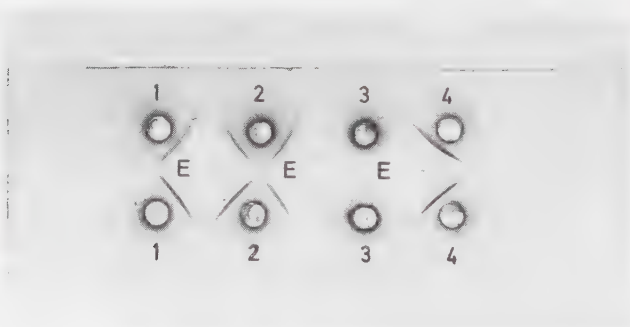


Abb. 10: Doppeldiffusion in Agar-Gel: Nachweis präzipitierender Antikörper im Serum von Rindern nach Immunisierung mit SEB-Kopolymeren. (1 - 4): Antisera von Rindern; (E): gereinigtes SEB, 30 µg/ml.

Da die präzipitierende Aktivität von Rinderantisera relativ gering ist (37), also nicht repräsentativ für die Gesamtzahl der Antikörpermoleküle, wurde auf die Quantitierung präzipitierender Antikörper verzichtet. Hinzu kommt, daß die präzipitierende Aktivität von Anti-SEB Antisera im Verlauf der Immunisierung abnahm.

4.4.2. Phagen-inaktivierende Antikörper

Nach Immunisierung mit kopolymerem SEB wurden die von den Meerschweinchen Nr. 1 - Nr. 3 gewonnenen Antisera mit Hilfe von SEB-T₄ auf das Vorhandensein Phagen-inaktivierender Antikörper untersucht. Als Referenz diente das Anti-SEB Antiserum der Fa. Makor. Wie die in Tabelle 1 zusammengestellten experimentellen Daten dokumentieren, lassen sich im Serum relativ hohe Konzentrationen Phagen-inaktivierender Antikörper nachweisen, die noch in Serumverdünnungen bis 10^{-6} 50 % von SEB-T₄ inaktivieren. Dieser Versuch zeigt auch, daß die Konzentration Phagen-inaktivierender Antikörper im Serum bereits nach zweimaliger Applikation von kopolymerem SEB höher ist, als bei im Handel befindlichen, durch mehrfache Restimulierung mit nicht-polymerem SEB hergestellten Anti-SEB Antisera.

Tabelle 1: Inaktivierung von SEB-T₄ durch Anti-SEB Antisera

Antisera	Serumverdünnung (50 % Inaktivierung)
Nr. 1	100 000
Nr. 2	100 000
Nr. 3	50 000
Makor	40 000

Beim Rind wurde die Kinetik der Antikörperbildung nach primärer und mehrfacher Restimulierung mit SEB-Kopolymeren untersucht. Zu diesem Zweck wurden von den Rindern Nr. 1 und Nr. 4 Antisera 2 - 3 Wochen nach der jeweiligen Antigenapplikation gewonnen, die einzelnen Abnahmen beider Rinder vereinigt und auf das Vorhandensein Phagen-inaktivierender Antikörper untersucht. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen sind in Abb. 11 zusammengefaßt.

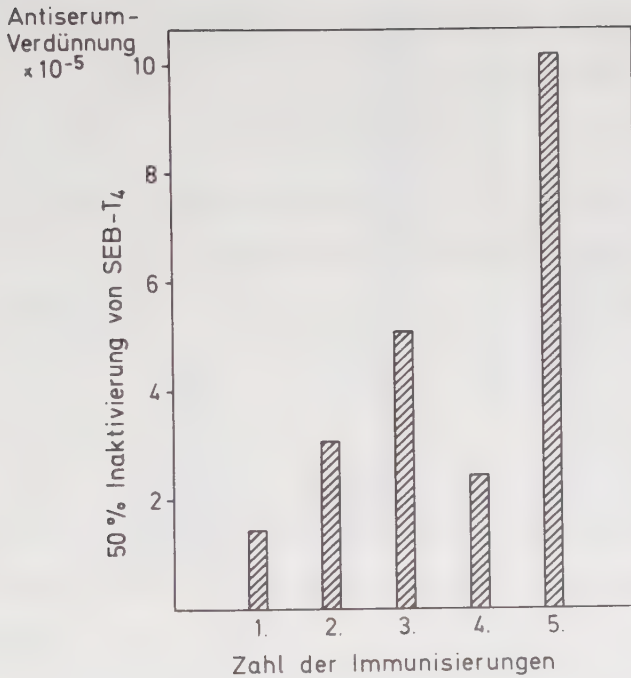


Abb. 11: Quantitative Bestimmung spezifischer Antikörper durch Inaktivierung von SEB-T₄ nach primärer und mehrfacher Restimulierung mit SEB-KSA von Rind Nr. 1 und Nr. 4 (Antiserumpool).

Die Analyse zeigt, daß sich die Konzentration zirkulierender Antikörper nach der Restimulierung gegenüber der primären Immunantwort um den Faktor 2 steigern läßt (Inaktivierungstiter $3,12 \times 10^{-5}$). Die 3. Immunisierung, die in einem zeitlichen Abstand von 7 Monaten nach der zweiten Applikation von SEB-KSA erfolgte, führte zu einer weiteren Steigerung der Konzentration Phagen-inaktivierender Antikörper (Inaktivierungstiter $5,12 \times 10^{-5}$). Nach der 5. Immunisierung ließ sich der Titer nochmals um den Faktor 2 steigern (Inaktivierungstiter $10,24 \times 10^{-5}$).

Antisera der graviden Rinder Nr.5 und Nr.6 wurden 2 - 3 Wochen nach der Restimulierung, d.h. unmittelbar vor der Geburt erhalten und auf Phagen-inaktivierende Antikörper geprüft. Entsprechende Untersuchungen erfolgten an der Kolostralmolke sowie an Kälberseren - 24 Stunden nach Kolostrumaufnahme. Die experimentellen Daten sind in Abb. 12 wiedergegeben.

Hier zeigte sich, daß die Konzentration von Anti-SEB Antikörpern im Blutserum tragender Rinder signifikant niedriger als bei nicht tragenden Tieren war (Inaktivierungstiter $1,8 \times 10^{-4}$ bzw. 4×10^{-4}).

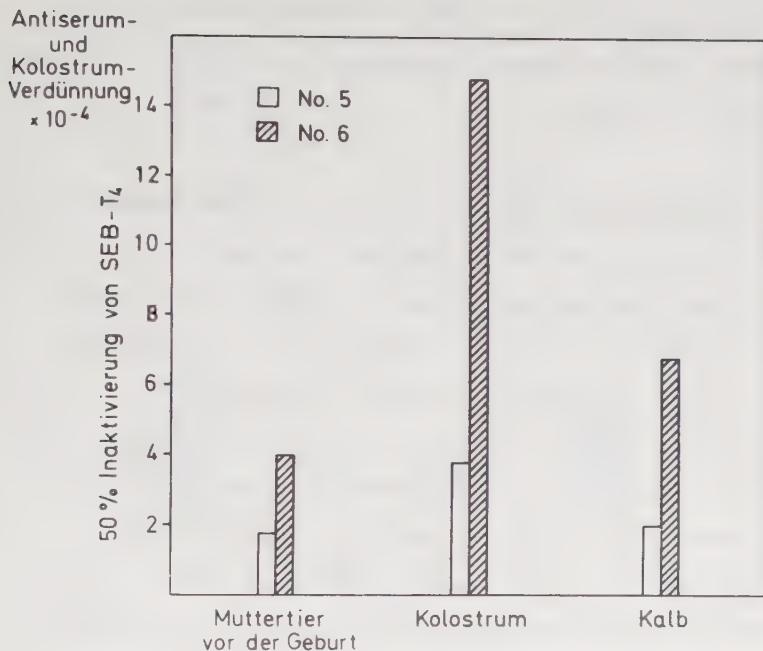


Abb. 12: Quantitative Bestimmung spezifischer Antikörper im Serum gravider Rinder (10 Tage vor der Geburt), im Kolostrum sowie im Neugeborenenserum nach Restimulierung mit SEB-KSA. Der Antikörpernachweis erfolgte durch Inaktivierung von SEB- T_4 .

Die experimentellen Daten dokumentieren, daß es im Vergleich zur Serumkonzentration bei Rind Nr. 5 zu einer 2-fachen und bei Rind Nr. 6 zu einer über 3-fachen Steigerung der Antikörper im Kolostrum kommt. Das Vorhanden-

sein von Anti-SEB Antikörpern in den Kälberseren in signifikanten Konzentrationen ist einmal mehr ein Beweis dafür, daß Antikörper über die Darmschleimhaut als intaktes Molekül resorbiert werden.

4.5. Verteilung von Anti-SEB Antikörpern in IgG-Subklassen

Antisera wurden von graviden Rindern Nr.5 und Nr.6 2 - 3 Wochen nach der Restimulierung gewonnen, anschließend wurde durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat eine Ig-Rohfraktion isoliert und durch Rechromatographie an Sephadex G-200 gereinigt (IgG). Die Fraktionierung in Subklassen IgG₂, IgG₁ und IgG_S erfolgte durch Chromatographie der 7S Fraktion an DEAE-Sephadex A50. Die Verteilung der spezifischen Anti-SEB Aktivität in den einzelnen Subklassen sowie Anti-SEB Antikörper im Neugeborenenserum wurde durch Phagentest bestimmt. Die in Abb. 13 wiedergegebenen experimentellen Daten sind ein überzeugender Beweis dafür, daß über 70 % der Antikörperaktivität mit der IgG_S-Subklasse assoziiert ist. Weitaus geringer hingegen war die Antikörperkonzentration in den Subklassen IgG₂ und IgG₁. Da Serum-IgG_S als einzige Subklasse über die kolostralproduzierende Mamma ausgeschieden wird, ist es verständlich, daß die mit dem kolostralen IgG_S assoziierte Antikörperkonzentration mit der des Serum-IgG_S korreliert.

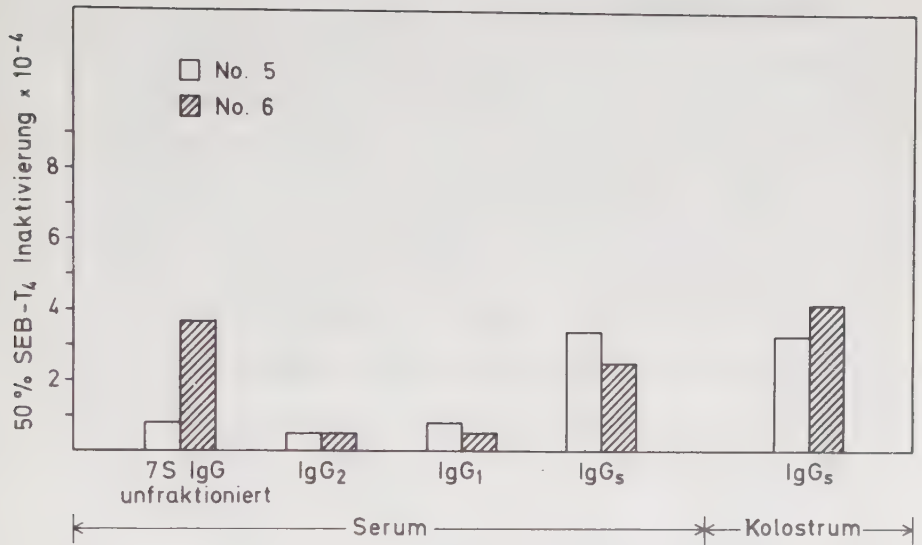


Abb. 13: Verteilung SEB-T₄ inaktivierender Antikörper in IgG-Subklassen (20 mg/ml) im Serum und Kolostrum von Rind Nr. 5 und Nr. 6 nach sekundärer Stimulierung mit SEB-KSA.

4.6. Hemmung der Inaktivierung von SEB-T₄ als Nachweismethode für SEB

Die quantitative Bestimmung von Anti-SEB Antikörpern erfolgte mit Hilfe eines Testsystems, das die Hemmung der Inaktivierung von SEB-T₄ mißt. Zu diesem Zweck wurde lösliches SEB mit Bakteriophagen konjugiert (SEB-T₄). Die Inaktivierung von SEB-T₄ folgte einer Kinetik erster Ordnung und erreichte bei einer Serumverdünnung von $1,28 \times 10^{-5}$ 60 %. Dieser Inaktivierungsprozess ließ sich durch die in einem ersten Schritt erfolgende Reaktion des Antiserums mit löslichem SEB hemmen. Wie Abb. 14 zeigt, genügen 8,2 ng SEB/ml für eine 50 % Hemmung und 3,7 ng SEB/ml für eine 33 % Hemmung der Inaktivierung von SEB-T₄ durch Anti-SEB Antikörper.

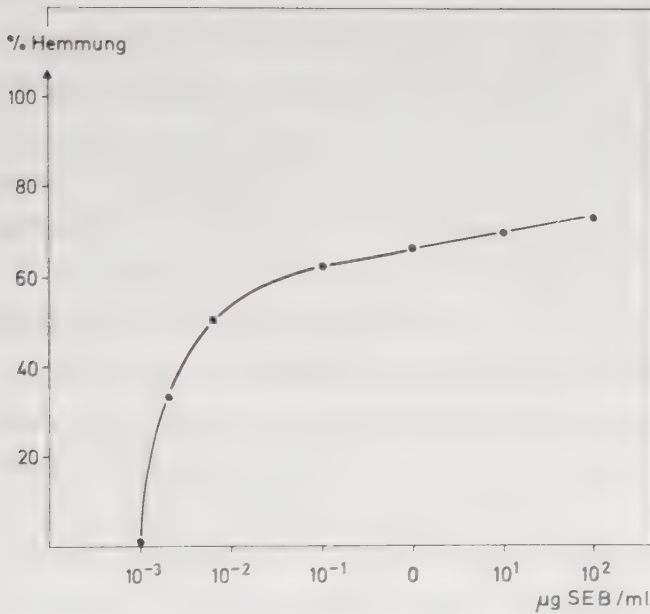


Abb. 14: Hemmung der Inaktivierung von SEB-T₄ in Gegenwart von freiem SEB.

Inkubation von Anti-SEB mit freiem SEB 1 Stunde bei 37°C, danach Zusatz von SEB-T₄ mit anschließender Plattierung.

5. DISKUSSION =====

Der Nachweis von SEB in Lebensmitteln stützt sich heute nahezu ausschließlich auf empfindliche immunologische Testverfahren. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, standardisierte Anti-SEB Antisera für diagnostische Zwecke in größerem Umfang und unter möglichst wirtschaftlichen Gesichtspunkten im Großtier zu produzieren. Zu diesem Zweck stand aus Staphylokokken-Kulturen gewonnenes SEB-Rohtoxin zur Verfügung. Durch die Kombination chromatographischer Verfahren, wie Ionenaustauscher und Gelfiltration, wurde das Präparat gereinigt und erwies sich in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS (Abb.3) als heterogen. Nach Chromatographie an Bio-Gel P-60 wurden 46 % des eingesetzten Rohtoxins als gereinigtes SEB wiedergewonnen. Das Präparat war einmal durch seine spezifische Reaktionsfähigkeit mit Anti-SEB in der Doppeldiffusion in Agar-Gel charakterisiert und erwies sich in der analytischen Disk-Elektrophorese in Gegenwart von SDS sowie in der analytischen Ultrazentrifuge als homogene Substanz.

Da gereinigtes SEB für Immunisierungen am Großtier eingesetzt werden sollte, war es notwendig, das Präparat zu detoxifizieren, bei voller Erhaltung der antigenen Spezifität. Bereits früher wurde gezeigt, daß durch die kombinierte Behandlung von SEB mit Essigsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid

und Methylharnstoff Aminogruppen blockiert und dadurch die Toxizität des Moleküls reduziert wird (8). Andererseits ist bekannt, daß freie Aminogruppen von Proteinen mit Glutaraldehyd reagieren und auf diesem Weg zu unlöslichen Derivaten vernetzt werden können (3). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde gereinigtes SEB in Gegenwart von Trägerproteinen kopolymer vernetzt, mit dem Ziel a) die Toxizität des SEB-Moleküls zu reduzieren und b) gleichzeitig die Immunogenität zu steigern.

In Modellversuchen an Kaninchen und Meerschweinchen ließ sich zeigen, daß die Applikation von vernetztem SEB mit Dosen im Milligrammbereich a) von den Tieren reaktionslos vertragen wurde und b) bereits nach einmaliger Restimulierung zu einer signifikanten Antikörperproduktion führte. Da natives SEB im angegebenen Dosisbereich beim Kaninchen hoch toxisch ist (51), ist aus dem Modellversuch der Schluß zu ziehen, daß die Vernetzung von SEB-Molekülen durch Glutaraldehyd mit einer Reduktion der toxischen Aktivität verbunden ist. In der Doppeldiffusion in Agar-Gel bilden Antisera gegen kopolymerisiertes SEB und solche gegen natives SEB nach Reaktion mit nativem SEB koaleszierende Präzipitationslinien, was ein Beweis für immunologische Identität ist. Daraus kann gefolgert werden, daß die antigene Spezifität des nativen Moleküls durch Vernetzung mit Glutaraldehyd nur unerheblich verändert wird. In ver-

gleichenden Untersuchungen über das Immunisierungsvermögen von nativem Toxin und Toxoid ist gezeigt worden, daß die Applikation von nativem SEB zu einer quantitativ und qualitativ besseren Antikörperbildung führt (54). Dies setzt jedoch eine Vielzahl von Restimulierungen mit kleinsten Antigendosen voraus. Mit SEB-Kopolymeren hingegen gelingt es, bereits nach einmaliger Restimulierung eine vergleichbare Antikörperproduktion zu induzieren.

Da die Applikation von SEB-Kopolymeren beim Rind nur zu kurzfristigen klinischen Symptomen führte und ohne Einfluß auf die Gravidität war, könnte dies einmal mehr ein Beweis für die reduzierte Toxizität des Präparates sein. In diesem Zusammenhang sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß Ziegen gegenüber SEB sehr viel weniger empfindlich sind (34), als dies für Kaninchen zutrifft. Dies könnte dafür sprechen, daß Wiederkäuer, also auch das Rind, entweder a) über eine geringere Zahl an Toxinrezeptoren verfügen oder b) Rezeptoren mit geringerer Affinität für das SEB-Molekül besitzen. Die Immunisierung von Rindern mit SEB-Kopolymeren führte bereits nach einmaliger Restimulierung zu Konzentrationen präzipitierender Antikörper im Serum, die mit denen handelsüblicher Antisera vergleichbar waren.

Bei Untersuchungen über die Verteilung der Antikörperaktivität ließ sich zeigen, daß präzipitierende Antikörper ausschließlich mit der IgG_S-Subklasse assoziiert waren. Es fiel jedoch auf, daß die präzipitierende Aktivität der Antisera bzw. der IgG_S-Fraktionen im Verlauf der Immunisierung immer mehr abnahm. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei Immunisierungen, die sich über einen langen Zeitraum erstrecken, immer mehr die Synthese von Molekülen begünstigt wird, die keine präzipitierenden Eigenschaften besitzen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von KLINMAN und Mitarbeitern (28), die zeigen konnten, daß die Immunisierung von Pferden mit p-Aminophenyl- β -lactosid bevorzugt zur Bildung von Antikörpern führte, die mit definierten Immunglobulinklassen assoziiert waren. Diese Moleküle zeigten hohe Bindungs-, jedoch keine präzipitierende Aktivität.

Weiterhin wurde beobachtet, daß das mehrfache Einfrieren und Auftauen bei -30°C konservierter Antisera mit einem Verlust präzipitierender Aktivität verbunden war. Die Gründe dafür könnten darin liegen, daß durch diese Manipulation die Bildung von Aggregaten oder die enzymatischer Spaltprodukte von Ig begünstigt wird, was in beiden Fällen zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit mit dem Antigen führt. Versuche, die präzipitierenden Eigenschaften von

Anti-SEB Antisera bzw. antikörperhaltige IgG₅-Fraktionen durch Zusatz von Polyäthylenglycol 6000 (18) und L-DOPA (50) zu verbessern, waren nicht erfolgreich.

Die Beobachtung, daß im Rinderserum die gesamte Antikörperpopulation nur zum Teil und vorübergehend durch präzipitierende Antikörper repräsentiert wird, hat dazu veranlaßt, einen zweiten Parameter zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern einzusetzen.

Wie bereits frühere Untersuchungen gezeigt haben, ist es möglich, Bakteriophagen mit einer ganzen Reihe von Haptenen bzw. Proteinen zu kuppeln, mit deren Hilfe es gelingt, Antikörper mit entsprechenden Spezifitäten noch im Pico-grammbereich nachzuweisen (14). Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, SEB mit T₄-Bakteriophagen zu konjugieren (39), die sich über einen langen Zeitraum als stabil erwiesen und den empfindlichen Nachweis von Anti-SEB Antikörpern noch in einer Serumverdünnung von 10⁻⁶ gestatteten.

Wie die Untersuchungen zeigten, wurde nach zweifacher Restimulierung mit SEB-KSA ein Maximum der Antikörperkonzentration im Serum erreicht, die sich jedoch nach zwei weiteren Restimulierungen noch beträchtlich steigern ließ. Im Gegensatz hierzu ist bei früheren Untersuchungen festgestellt worden, daß bei Rindern nach der zweiten Immunisierung

mit verschiedenen Antigenen das Maximum der Antikörperbildung erreicht wird, die sich auch durch weitere Restimulierungen nicht mehr steigern läßt (37).

Bei Untersuchung der Antikörperaktivität in den IgG-Subklassen, gemessen auf der Basis gleicher Proteinkonzentrationen, war nach einmaliger Restimulierung der überwiegende Teil der Antikörper-Moleküle (69 %) mit der IgG₅-Subklasse assoziiert. Demgegenüber enthielt die IgG₂-Subklasse 21 % und die IgG₁ nur 10 % der Antikörperaktivität. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß zwischen der Ladung des Antigens und der des Antikörpers, deren Synthese durch dieses Antigen induziert wird, eine inverse Beziehung besteht (49). So führt beispielsweise die Immunisierung bei Rindern mit basischem Lysozym fast ausschließlich zur Bildung von IgG₅-Antikörpern, die mit einer höheren Nettoladung ausgestattet sind (37). Da SEB durch seinen isoelektrischen Punkt (pI = 8,6) als mehr basisches Antigen charakterisiert ist, würde in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von MOSSMANN und Mitarbeitern (37) verständlich sein, daß dieses Molekül bevorzugt die Synthese von IgG₅-Antikörpern stimuliert. Es besteht Evidenz dafür, daß IgG₅-Moleküle vor der Geburt aus dem Plasma ausgeschleust und selektiv an Membranrezeptoren der Epithelzellmembran in der Mamma gebunden werden (25). Dies führt, wie gezeigt werden konnte,

zu einer Anreicherung von Anti-SEB Molekülen der IgG_S-Subklasse im Kolostrum, die oftmals um den Faktor 3 bis 4 über der des Serums lag.

Somit bietet die Immunisierung von Rindern mit SEB die einmalige Chance, aus dem Kolostrum spezifische Antikörper in größerem Umfang zu isolieren und rein darzustellen. Auf diese Weise würde es möglich sein, speziesspezifische Anti-SEB Antikörper ohne großen Kostenaufwand in genügender Menge für die Routinediagnostik zur Verfügung zu stellen. Allerdings muß hier die Einschränkung gemacht werden, daß bovine Anti-SEB Antikörper nur in Ausnahmefällen präzipitieren und daher für Präzipitationsverfahren zum Nachweis von SEB ausscheiden.

Ein weiteres wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von SEB aufzubauen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß es auf dem Wege der Hemmung von SEB-T₄ gelingt, SEB nachzuweisen. Dabei lag die Empfindlichkeit zwischen 3 und 8 ng/ml.

Was die Empfindlichkeit dieser Methode zum Nachweis von SEB betrifft, so ist sie mit den Hämagglutinationsmethoden bzw. dem radioimmunologischen Nachweisverfahren vergleichbar. Da bei der Hämagglutination oftmals unspezifische Reaktionen auftreten, wird die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens stark eingeschränkt (55). Gegenüber radioimmunologischen

Verfahren (10, 23, 24) hat die Hemmung von SEB-T₄ den Vorteil, daß für die Durchführung lediglich ein gereinigtes SEB, nicht jedoch gereinigte Anti-SEB Antikörper erforderlich sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dieses analytische Verfahren neue Möglichkeiten zum empfindlichen Nachweis von SEB eröffnet. Inwieweit sich diese Methode dazu eignet, den Nachweis von SEB im Lebensmittel zu führen, wird durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden müssen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Durch Chromatographie eines Staphylokokken-Rohtoxins (Enterotoxin B; SEB) an Bio-Gel P-60 gelang es, SEB zu reinigen. Das Präparat reagierte spezifisch mit Anti-SEB Antisera und erwies sich in der analytischen Polyacrylamid-gel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat sowie in der analytischen Ultrazentrifuge als homogen.

Gereinigtes SEB wurde in Gegenwart von Kaninchenserumalbumin (SEB-KSA) mit Glutaraldehyd zu Kopolymeren vernetzt. In Modellversuchen an Kaninchen und Meerschweinchen ließ sich zeigen, daß die Vernetzung von SEB-Molekülen zu einer Reduktion der Toxizität führte ohne wesentliche Änderung der antigenen Spezifität. Analog hierzu zeigte auch die Immunisierung von Rindern, daß SEB-Kopolymere weitgehend atoxisch sind und eine spezifische Immunantwort induzieren, die sich nach mehrfacher Restimulierung signifikant steigern ließ.

Die quantitative Bestimmung von Anti-SEB Antikörpern erfolgte a) durch Präzipitationsreaktion und b) durch Inaktivierung SEB-konjugierter T_4 -Bakteriophagen (SEB- T_4). Während Antisera, gewonnen 14 Tage nach der ersten Restimulierung, mit SEB präzipitierten, war der spätere Verlauf der Immunisierung ausschließlich durch nicht präzipitierende Antikörper gekennzeichnet.

Bei Untersuchungen über die Verteilung der Antikörpermoleküle in IgG-Subklassen zeigte sich, daß nahezu 70 % der Anti-SEB Aktivität mit der IgG_S-Fraktion assoziiert war. So stimulierte SEB als basisches Antigen bevorzugt die Synthese mehr negativ geladener IgG_S-Antikörper. Anti-SEB Antikörper der IgG_S-Subklasse wurden während der Kolostralphase selektiv in der Mamma angereichert und in einer Konzentration im Kolostrum ausgeschieden, die um den Faktor 2 bis 3 über der des Serums lag.

Es besteht experimentelle Evidenz dafür, daß die spezifische Inaktivierung von SEB-T₄ durch freies SEB gehemmt werden kann. Auf dieser Basis wurde ein empfindliches Verfahren entwickelt, das es gestattet, SEB noch in Konzentrationen zwischen 3 und 8 ng SEB/ml reproduzierbar nachzuweisen. Inwieweit sich diese Methode auch zum Nachweis von SEB in Lebensmitteln eignet, werden weitere Untersuchungen klären müssen.

SUMMARY
=====

Staphylococcal enterotoxin B (SEB) was purified from a crude toxin by chromatography on Bio-Gel P-60. Purified SEB was found to be homogenous in polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate as well as in the analytical ultracentrifuge and reacted with anti-SEB specifically. Insoluble derivatives were obtained by cross-linking SEB with glutaraldehyde in the presence of rabbit serum albumin (SEB-KSA). By using rabbits and guinea pigs as experimental models it could be shown, that the toxicity of the SEB molecule was drastically reduced by polymerisation without definitive changes of the antigenic specificity. Furthermore as can be drawn from the immunization of cattle that cross-linking of SEB with glutaraldehyde brings the toxic activity below the danger point. Cattle given SEB-KSA repeatedly responded with an increased antibody synthesis. Anti-SEB antibodies were determined by a) precipitin reaction und b) inactivation of SEB conjugated T_4 -bacteriophages (SEB- T_4). In antisera collected early in the course of immunization antibodies were found to precipitate with SEB. As immunization progressed, however the immune response was reflected by non-precipitating antibodies. Immunization of cattle with SEB (a basic antigen) preferentially provoked the synthesis of the more negatively charged IgG_S antibodies.

The concentration of anti-SEB antibodies present in the IgG₅ subclass in colostrum exceeded 2 to 3 times that of the serum.

In experiments with chemically modified bacteriophage technique, SEB-coated phage was efficiently inactivated with anti-SEB antibody and this reaction could be totally inhibited with the free SEB. On the basis of these results a test system was developed sufficiently sensitive to detect 3 to 8 ng SEB/ml in a reproducible manner. If this assay is a helpful step to the detection of SEB in foods has to be clarified by further experiments.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. ADAMS, M.H.: Bacteriophages, (Hrsg.: Adams, M.H.) Interscience Publishers, Inc., New York, (1959).
2. ANDERSON, E.H.: Growth requirements of virus resistant mutants of *Escherichia coli* strain B, *Natl.Acad.Sci.Proc.* 32, (1946) 120-128.
3. AVRAMEAS, S. und TERNYNCK, T.: The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunadsorbents, *Immunochemistry* 6, (1969) 53-66.
4. BECK, Gg. und HENNER, S.: Staphylokokkeninfektionen als Ursache von Lebensmittelvergiftungen, *Tierärztl.Umschau* 25, (1970) 414-421.
5. BERGDOLL, M.S.; SURGALLA, M.J. und DACK, G.M.: Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property, *J.Immunol.* 83, (1959) 334-338.
6. BERGDOLL, M.S.: Chemistry and detection of staphylococcal enterotoxin, *Proc.14th Res.Conf.Am.Meat Inst.Found.*, *Circ.No.70*, (1962) 47.
7. BERGDOLL, M.S.; CHU, F.S.; HUANG, I.-Y.; ROWE, C. und SHIH, T.: Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties and the N- and C-terminal amino acid sequences, *Arch.Biochem.Biophys.* 112, (1965) 104-110.
8. BERGDOLL, M.S.: Enterotoxins in S.J.Ajl, T.C.Montie und S.Kadis (eds.), *Microbiol.Toxins*, Vol.III, Academic Press, New York, (1970) 265-296.
9. BERGDOLL, M.S.: Staphylococci in J.O.Cohen (ed.), Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, (1972) 301.

10. COLLINS, W.S.; METZGER, J.F. und JOHNSON, A.D.: A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin, J.Immunol. 108, (1972) 852-856.
11. DOLMAN, C.E. und WILSON, R.J.: Experiments with staphylococcal enterotoxin, J.Immunol. 35, (1938) 13-30.
12. FRANEK, F. und SIMEK, L.: The antibody response of pigs to dinitrophenylated bovine IgG administred with a novel type of adjuvant, Europ.J.Immunol. 1, (1971) 300-302.
13. HAIMOVICH, J.; HURWITZ, E.; NOVIK, N. und SELA, M.: Preparation of protein-bacteriophage conjugates and their use in detection of anti-protein antibodies, Biochim. Biophys.Acta 207, (1970) 115-124.
14. HAIMOVICH, J.; HURWITZ, E.; NOVIK, N. und SELA, M.: Use of protein-bacteriophage conjugates for detection and quantitation of proteins, Biochim.Biophys.Acta 207, (1970) 125 -129.
15. HALL, H.E.; ANGELOTTI, R. und LEWIS, K.H.: Quantitative detection of staphylococcal enterotoxin B in food by gel-diffusion methods, Public Health Rept.(US) 78, (1963) 1089-1098.
16. HAMMER, D.K.; KICKHÖFEN, B. und HENNING, G.: Molecular classes and properties of antibodies in cattle serum and colostrum synthesized during primary and secondary response to protein antigens, Europ.J.Biochem. 6, (1968) 443-454.
17. HAMMER, D.K.; KICKHÖFEN, B. und HENNING, G.: Studies on the formation and association characteristics of IgG class antibodies in bovine serum and colostrum against protein antigens, J.Immunol. 104, (1970) 1016-1023.
18. HARRINGTON, J.C.; FENTAN II J.W. und PERT, J.H.: Polymer-induced precipitation of antigen-antibody complexes: Precipiplex reactions, Immunochemistry 8, (1971) 413-421.

19. HEIMBURGER, N. und SCHMIDTBERGER, R.: Moderne Verfahren der Chromatographie und Elektrophorese zur Präparation von Plasmaproteinen, Behring-Mitteilung, 43, (1964) 83-128.
20. HIRSCHFELD, J.: Immuno-electrophoresis - Procedure and application to the study of group-specific variations in sera, Sci.Tools 7, (1960) 18-27.
21. HUANG, I.-Y. und BERGDOLL, M.S.: The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B and the complete amino acid sequence, J.Biol.Chem. 245, (1970) 3518-3525.
22. JOHNSON, H.M.; HALL, H.E. und SIMON, M.: Enterotoxin B: Serological assay in cultures by passive hemagglutination, Appl.Microbiol. 15, (1967) 815-818.
23. JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A.; KAUFFMANN, P.E. und PEELER, J.T.: Staphylococcal enterotoxin B: Solide phase radioimmunoassay, Appl.Microbiol. 22, (1971) 837-841.
24. JOHNSON, H.M.; BUKOVIC, J.A. und KAUFFMANN, P.E.: Staphylococcal enterotoxins A and B: Solide phase radio-immunoassay in food, Appl.Microbiol. 26, (1973) 309-313.
25. KEMMLER, R.; MOSSMANN, H.; STROHMAIER, U.; KICKHÖFEN, B. und HAMMER, D.K.: In vitro studies on the selective binding of IgG from different species to tissue sections of the bovine mammary gland, Europ.J.Immunol. 5, (1975) 603-608.
26. KICKHÖFEN, B.; HAMMER, D.K. und SCHEEL, D.: Isolation and characterisation of γ G type immunoglobulins from bovine serum and colostrum, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, (1968) 1755-1773.

27. KICKHÖFEN, B.; HAMMER, D.K. und WESTPHAL, M.: Occurrence of IgG fragments in the urine of newborn calf, Europ.J.Immunol. 1, (1971) 49-54.
28. KLINMAN, N.R.; ROCKEY, J.H.; FRAUENBERGER, G. und KARUSH, F.: Equine anti-hapten-antibody. III. The comparative properties of γ G- and γ A-Antibodies. J.Immunol. 96, (1966) 587-595.
29. LAURELL, C.B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies, Anal.Biochem. 15, (1966) 45-52.
30. MAASSEN, W.: Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken Enterotoxin in England und Wales (1952-1962) sowie in den USA (1961-1964), Zbl.Bakt.I.Ref. 199, (1965) 213-219.
31. MAIZEL, J.V.: Preparative electrophoresis of proteins in acrylamid gels, Ann.New York Acad.Sci. 121, (1964) 382-390.
32. MANCINI, G.; CARBONARA, A.O. und HEREMANS, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, Immunochemistry 2, (1965) 235-254.
33. MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese, (Hrsg. Maurer, H.R.) Walter de Gruyter & Co., Berlin, (1968) 43.
34. METZGER, J.F.: mündliche Mitteilung.
35. MICHAEL, S.E.: The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents, J.Biochem. 82, (1962) 212-218.
36. MORTALITY and MORBIDITY Weekly Report 19, (1970) 151.
37. MOSSMANN, H.; BARTSCH, K.; RÜDE, E.; KICKHÖFEN, B. und HAMMER, D.K.: The influence of the net charge of antigen on the distribution of bovine IgG class antibodies, Europ.J.Immunol. 3, (1973) 293-298.

38. MOSSMANN, H. und HAMMER, D.K.: Bacteriophage conjugates: The effect of coupling reaction and specific antibodies on the kinetics of inactivation and reactivation, Z.Naturforsch. 28c, (1973) 83-90.
39. MOSSMANN, H.: unveröffentlicht.
40. OAKLEY, C.L. und FULTHORPE, A.J.: Antigenic analyses by diffusion, J.Path.Bact. 65, (1953) 49-60.
41. OUCHTERLONY, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels, Arkiv.Kemi.Min.Geol. 26 B, (1948) 1-9.
42. OUCHTERLONY, Ö.: Handbook of experimental immunology, (Hrsg. Weir, D.M.) Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh (1967).
43. OUDIN, J.: III. Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction. B. Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis, Methods Med. Res. 5, (1952) 335-378.
44. PETERSON, E.A. und SOBER, H.A.: Variable gradient device for chromatographie, Analyt.Chem. 31, (1959) 857-862.
45. PORATH, J. und UI, N.: Chemical studies on immunoglobulins. I. A new preparative procedure for γ -globulins employing glycine rich solvent systems, Biochim.Biophys.Acta 90, (1964) 324-333.
46. READ, R.B. Jr.; BRADSHAW, J.G.; PRITCHARD, W.L. und BLACK, L.A.: Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese, J.Dairy Sci. 48, (1965) 420-424.
47. READ, R.B. Jr. und BRADSHAW, J.G.: Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in veronal-buffer, Appl.Microbiol. 14, (1966) 130-132.
48. SCHANTZ, E.J.; ROESSLER, W.G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERY, D.A. und BERGDOLL, M.S.: Purification of staphylococcal enterotoxin B, Biochem. 4, (1965) 1011-1016.

49. SELA, M. und MOZES, E.: Dependence of the chemical nature of antibodies on the net electrical charge of antigens, Proc.Nat.Acad.Sci. US 55, (1966) 445-452.
50. SIEBER, A. und BECKER, W.: Quantitative determination of IgE by simple radial immunodiffusion. A comparison of three different methods for intensification of precipitates, Clinica chimica Acta 50, (1974) 153-155.
51. SILVERMAN, S.J.: Serological assay of culture filtrates for staphylococcus enterotoxin, J.Bacteriol. 85, (1963) 955-956.
52. SILVERMAN, S.J.; KNOTT, A.R. und HOWARD, M.: Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods, Appl.Microbiol. 16, (1968) 1019-1023.
53. SILVERMAN, S.J.; ESPESETH, D.A. und SCHANTZ, E.J.: Effect of formaldehyd on the immunochemical and biological activity of staphylococcal enterotoxin B, J.Bacteriol. 98, (1969) 437-442.
54. SILVERMAN, S.J.; MOORE, G.T. und ROESSLER, W.G.: Effect of formaldehyde on the immunogenicity of staphylococcal enterotoxin B for macaca mulatta, J.Bacteriol. 98, (1969) 443-446.
55. SOMMERFELD, P. und TERPLAN, G.: Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen, Arch.Lebensmittelhyg. 26, (1975) 121-137.
56. SURGALLA, M.J.; BERGDOLL, M.S. und DACK, G.M.: Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by monkey-feeding test, J.Lab.Clin.Med. 41, (1953) 782-788.

57. SVEDBERG, T. und PEDERSEN, K.O.: Die Ultrazentrifuge, Verlag Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940.
58. WARREN, J.R.; SPERO, L. und METZGER, J.F.: Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal enterotoxin B, J.Immunol. 111, (1973) 885-892.
59. WEICHSELBAUM, T.E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma, Amer.J.Clin.Pathol.Tech.Sect. 10, (1946) 40-49.
60. WEIRETHER, F.J.; LEWIS, E.E.; ROSENWALD, A.J. und LINCOLN, R.E.: Rapid quantitative serological assay of staphylococcal enterotoxin B, Appl.Microbiol. 14, (1966) 284-291.

Am Schluß meiner Arbeit sei es mir gestattet,
Herrn Prof. Dr. Gg. BECK für die Überlassung des Themas
und für die großzügige Unterstützung, die es mir ermög-
lichte, diese Arbeit am Landesuntersuchungsamt für das
Gesundheitswesen Südbayern - Fachbereich Veterinärmedizin -
Oberschleißheim durchzuführen, herzlich zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D.K. HAMMER,
Max-Planck Institut für Immunbiologie, Freiburg, für
die unermüdliche, hilfreiche Förderung der vorliegenden
Arbeit.

Für die Herstellung von SEB-konjugierten Bakteriophagen
sowie für wertvolle Anregungen und Diskussionen möchte
ich Herrn Dr. H. MOSSMANN, Max-Planck Institut für Immun-
biologie, Freiburg, danken.

Bei Herrn Prof. Dr. MAYR bedanke ich mich für die
Bemühungen um die vorliegende Arbeit.

Herrn BARTSCH, Max-Planck Institut für Immunbiologie,
Freiburg, danke ich für die Einarbeitung in analytische
Methoden.

Mein Dank gilt ferner H. KOCHANOWSKI, H. STROM und A. THOMA,
Max-Planck für Immunbiologie, Freiburg.

Schließlich möchte ich Frau FENZL für das Schreiben dieser
Arbeit sowie allen Kollegen, Mitarbeitern und Freunden, die
den Fortgang der Arbeit gefördert haben, meinen Dank aussprechen.

LEBENS LAUF

Am 16. April 1945 wurde ich als Sohn des Richters am Bundespatentgericht Dr.-Ing. Alfred Scheuber und seiner Ehefrau Selma, geb. Kühnle, in Neuendettelsau geboren.

Nach der Grundschule besuchte ich das naturwissenschaftliche Gymnasium in München, an dem ich im Sommer 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1967 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nachdem ich ein Semester wegen eines Autounfalles ausgesetzt hatte, legte ich am 12. April 1973 das tiermedizinische Staatsexamen ab.

Nach der Bestallung im Mai 1973 war ich vorübergehend als Assistent in der freien Praxis tätig.

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Zeit von November 1973 bis September 1976 am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern - Fachbereich Veterinärmedizin - in Oberschleißheim unter Leitung von Prof. Dr. BECK, Ltd. Veterinärdirektor, durchgeführt.

